



TITLE:

γ 線照射によって生じるクリスタリン中の酸化、脱アミド化部位の迅速分析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

金, 仁求

CITATION:

金, 仁求. γ 線照射によって生じるクリスタリン中の酸化、脱アミド化部位の迅速分析. 京都大学, 2016, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19517>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

京都大学	博 士（理 学）	氏名	金 仁求
論文題目	γ線照射によって生じるクリスタリン中の酸化、脱アミド化部位の迅速分析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>水晶体は光を透過させ焦点を網膜上に合わせるという機能を有する透明な器官である。水晶体の透明性はその主成分であるα-、β-、γ-クリスタリン間の相互作用によって保持されているが、加齢に伴いこれらクリスタリン間の相互作用が変化し凝集と不溶化が生じ、白内障が発症すると考えられている。しかし、これら加齢に伴うクリスタリンの凝集、不溶化機構には不明な点が多い。本研究では、生体組織に酸化ストレスを定量的に付与できるγ線を5—500 Gy、4週齢のラット水晶体に照射し、照射後の水晶体をホモジェナイズし、遠心分離により可溶性（water soluble: WS）画分と不溶性（water insoluble: WI）画分に分離した。その後、WSおよびWI画分をそれぞれトリプシン処理し、全タンパク質をペプチド断片化した。WI画分はトリプシン処理に先立ち、8 M 尿素で溶解し、尿素濃度を1 Mに減じた後、トリプシン処理した。得られた両画分由来のトリプシンフラグメントをone-shotで、液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/MS/MS）で一斉分析した。ペプチドの同定およびクリスタリン中のアミノ酸残基の翻訳後修飾に関してはProteome Discovererにより解析を行った。第一部ではγ-クリスタリン中の酸化、脱アミド化、第二部ではα-、β-クリスタリン中の酸化、脱アミド化を一斉解析し、これらの修飾によるクリスタリンの凝集と不溶化との関係について検討し、ヒト加齢性白内障との関連について考察した。</p> <p>第一部 ラット水晶体へのγ線照射によるγ-クリスタリンのアミノ酸残基の酸化および脱アミド化:</p> <p>5 Gyのγ線照射によりラット水晶体WS画分中のγE-and/or γF-クリスタリンのTrp69, Met 70, Met 102 残基が部位特異的に酸化されていた。これらの残基はASA (solvent accessible surface area) 解析によりγE- and/or γF-クリスタリンの分子表面に露出していることが判明し、酸化ストレスを受けやすいと考えられた。WI画分ではこれらの残基に加えて、多数のアミノ酸残基が酸化されていた。これらの酸化部位は加齢性白内障のヒト水晶体中のγ-クリスタリンの酸化部位と一致していた。次に、γ線5 Gy照射後のγ-クリスタリン中のAsnおよびGln 残基の脱アミド化について解析したところGln 48, 67, 68、Asn 161残基が脱アミド化されていることが判明した。50 Gy照射すると上記残基に加えてAsn50, Gln 55, Gln 13残基なども脱アミド化していた。</p>			

第二部 ラット水晶体への γ 線照射による α -および β -クリスタリンのアミノ酸残基の翻訳後修飾:

第二部では、放射線による水晶体含有タンパク質への影響の包括的な解明のため、5 Gyから500 Gyという広い線量範囲の γ 線を4週齢のラット水晶体に照射し、第一部と同様の方法でWSおよびWI画分中の α -、 β -クリスタリンのアミノ酸残基の酸化、脱アミド化、異性化に関して分析した。その結果、 α -および β -クリスタリンの酸化は未照射、および5 Gyの照射では生じず、50 Gy以上の照射によって初めて Met、Trp、His残基に生じた。第一部で述べたように γ -クリスタリン中のアミノ酸残基は5 Gyの照射で酸化したことから、 α -および β -クリスタリンは、 γ -クリスタリンと比較して γ 線照射に対して酸化されにくいことが示された。 α -および β -クリスタリン中のMet, Trp, His残基などの酸化部位はヒトの加齢性白内障のクリスタリン中で生じている酸化部位と共通していた。次に、 γ 線照射後のラット α -、 β -クリスタリン中のAsnおよびGln残基の脱アミド化について検討した。 α -、 β -クリスタリン中の脱アミド化は、5 Gy以上の γ 線照射によって多数のAsnおよびGln残基で生じた。これらの脱アミド化部位もヒト加齢性白内障水晶体クリスタリンにおいて検出されている部位と共通していた。脱アミド化によって、Asn残基はAsp残基へ、Gln残基はGlu残基へと変化し、タンパク質側鎖に負の電荷がもたらされるため、 γ 線照射によって誘導された脱アミド化は α -、 β -クリスタリンの構造およびタンパク質間の相互作用に変化をもたらすと考えられる。これを反映するように脱アミド化はWI画分に多く見られた。また、加齢性白内障のクリスタリン中で見出されているAsp残基の異性化が γ 線照射後のラット水晶体クリスタリンにおいても検出されると予測したが、どのクリスタリンにおいてもAsp残基の異性体は検出されなかった。過去の研究で、Asp残基の異性化は照射後、一定の時間を要していたことから、本研究における照射直後の試料では異性化に至る時間が不十分であると考えられた。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は放射線照射による α -、 β -、 γ -クリスタリンの翻訳後修飾（酸化、脱アミド化、異性化）についてタンパク質を精製することなくone shotで、微量（500 ng）の生体試料をLC/MS/MSで迅速に分析することに成功した。水晶体クリスタリンは初期には水溶性であるが、加齢もしくは白内障発症に伴って徐々に凝集および不溶化する。本研究により、酸化、脱アミド化は、4週齢の若いラット水晶体のクリスタリンには生じていないが、 γ 線照射により生じることが示された。

また、クリスタリンの種類により、放射線の感受性が異なることも初めて明らかとなった。さらに、酸化や脱アミド化は水晶体のWI画分のクリスタリン中に著しく生じていることが判明した。これらのことより、 γ 線によって生成するフリーラジカルやROSがクリスタリン中のアミノ酸残基の酸化や脱アミド化を惹起し、クリスタリンの性質やクリスタリン間の相互作用を変化させ、不溶化させたと考えられた。これらの酸化、脱アミド化部位はヒトの加齢性白内障のクリスタリンの酸化、脱アミド化部位と共通であることから、ヒトの水晶体中で生じるフリーラジカルやROSがクリスタリンの不溶化および白内障発症の一因と考えられる。

本研究において申請者は γ 線がタンパク質の不溶化と翻訳後修飾との関係を研究する上で有用なツールになることを明確に示した。その波及効果は放射線影響の基礎研究のみならず、広く生命科学の分野にも及ぶと考えられる。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成28年1月12日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降